

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860833

研究課題名(和文) Dravet症候群のiPS細胞モデルにおける治療標的の選定と創薬基盤研究

研究課題名(英文) Identification of therapeutic targets and drug discovery research for Dravet syndrome using iPSCs model

研究代表者

田中 泰圭 (Tanaka, Yasuyoshi)

福岡大学・てんかん分子病態研究所・ポスト・ドクター

研究者番号：50714466

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Dravet症候群(DS)の病態研究ならびに創薬研究の発展に寄与するため、患者由来iPS細胞の樹立、アイソジェニックな人工健常コントロールiPS細胞の作製、活動電位測定による各種神経細胞の機能的差異を検討した。本研究において、新たに3検体よりDS患者由来iPS細胞の樹立に成功した。また、1検体においては、TALEN法によるゲノム編集技術を用いてDS患者由来の人工健常コントロールiPS細胞の作製にも成功した。機能異常の有無を同定するまでには至らなかったが、次世代多電極アレイシステムを用いた神経細胞の活動電位測定に成功したため、今後、新たな創薬基盤研究への応用が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to contribute to deciphering the pathogenic mechanisms and facilitating drug discovery for Dravet syndrome (DS), we established 1) patient-derived iPSCs, 2) generated an isogenic control cell line derived from DS patient iPSCs by genome editing using TALEN method, and 3) investigated the functional differences in neuronal cells between control and DS cells via functional analysis of action potential measurement. In this study, we generated iPSC lines derived from three DS patients. To establish isogenic control cells, we generated a genome-edited control cell line from one of the DS iPSC lines by substituting the point mutation with the wild-type residue using TALEN. This artificial control iPSC line will be a powerful tool for research into the pathology of DS. We measured action potential in iPSC-derived excitatory neurons by use of a microelectrode array system. The results of this study can be applied to research for drug discovery and development against DS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Dravet症候群 SCN1A iPS細胞 TALEN ゲノム編集 興奮性神経 抑制性神経

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんは人口の1%が罹患し、生涯罹患率が3%に及び高頻度な脳の疾患で、3割が現行の抗てんかん薬で発作を抑制できない難治てんかん患者である。乳幼児期に発症する難治てんかんでは重篤な発作のみならず、発達や認知・行動の障害を伴い、患者・家族への負担は測り知れない。ドラベ症候群は原因遺伝子異常が明確となった数少ない乳児期発症難治てんかんの一つであり、発作重積等により1-2割の患者が若年死亡する。

ドラベ症候群では約80%の患者に、電位依存性Na<sup>+</sup>チャネルNa<sub>v</sub>1.1のサブユニットをコードするSCN1A遺伝子の異常が同定される。SCN1Aを改変したドラベ症候群モデルマウスを用いた研究が種々行われており、このため、前脳GABA性介在神経細胞におけるNa<sub>v</sub>1.1のハプロ不全が脳の抑制性の機能不全をもたらし、てんかんを発病すると考えられている。さらにこの病態が若年死亡や自閉症とも関連することが示唆されている。しかし、げっ歯類とヒト脳における神経細胞基盤の違いは周知の通りであり、モデルマウスが必ずしも患者の病態を反映しているとは言い難い。より複雑な病態が推定されるヒトの病態・治療研究には、患者由来神経細胞を併せて用いることが望ましい。

申請者らの施設は本邦におけるてんかん遺伝子研究の中心施設の1つであり、多くのてんかん患者のゲノムを保有している。さらに、我々がSCN1A異常を同定したドラベ症候群患者9例に対して繊維芽細胞を採取・保存しており、すでに1例ではiPS細胞を樹立(D1 iPSCs)し、世界に先駆けてGABA性神経細胞における電気生理学的な機能の低下を同定した。今後は他検体からも順次iPS細胞を樹立し、細胞レベルでの疾患関連表現型の妥当性を深めるとともに、細胞間の特性的パラつきによる差異の低減と信頼性の高い実験系を確立する必要がある。SCN1A遺伝子の変異同定による遺伝子診断は可能だが、詳細な分子病態は未だ不明な点が多く、効果的な治療法が未確立であり、早期の病態解明と新たな根治薬および治療法の開発が急務であり、悲願である。

## 2. 研究の目的

乳児期発症難治てんかんの一つ、ドラベ症候群患者から作製したiPS細胞を各種神経細胞へ分化させ、それぞれについて機能異常の有無を検討し、本疾患の病態を明らかにする。これによって治療ターゲットを明確にし、疾患病態研究ならびに創薬研究の発展を推進する創薬研究へ発展させる。そのために、樹立したiPS細胞のSCN1A遺伝子変異をTALEN法(Transcription Activator-Like Effector Nuclease)を用いて修復する。遺伝子を修復した細胞を実験の正常対象群に用いること

により、さらに信頼性の高い実験系の確立を目指す。さらに、神経細胞の種類は多様であるため、興奮性グルタミン酸神経細胞や抑制性GABA神経細胞における細かなサブタイプ(パルブミン陽性、カルレチニン陽性、ソマトスタチン陽性神経細胞)毎に解析を行い、適切な治療ターゲットの選定を行うことが重要である。これらにより、ドラベ症候群患者における真の細胞分子病態の解明につながることを期待される。認可医薬品の薬剤スクリーニングへの応用が可能な病態モデルを作成することで、革新的な治療法や予防法の開発につなげることを目指し、創薬基盤研究の発展に寄与する。

## 3. 研究の方法

- (1) DS患者由来iPS細胞の樹立：患者皮膚繊維芽細胞は、上腕皮膚よりパンチ生検にて採取し、すでに保存済みである。iPS細胞の樹立方法はエピソード・プラスミドを用いて初期化因子(OCT4、SOX2、KLF-4、L-MYC、LIN28、p53 shRNA)を繊維芽細胞に導入し作製する方法を用いた。
- (2) iPS細胞のキャラクタリゼーション：免疫染色法による未分化マーカー(OCT4、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81)の発現解析を行った。*In vitro*三胚葉分化方をも用いて、三胚葉分化マーカー( $\beta$ III-tubulin、SMA、AFP)の発現解析により、多分化能を維持した品質のよいクローンを選択した。G-band法により核型異常の有無を解析した。
- (3) DS患者由来の人工健常コントロールiPS細胞の樹立：TALEN法を用いて、SCN1A遺伝子のエクソン26にナンセンス変異(c.4933C>T, p.R1645\*)を有するDS患者由来iPS細胞(D1 iPSCs)の遺伝子異常の修復を試みた。TALENのoff-target解析にはWhole-genome sequencingおよびPROGNOSツールを用いた。
- (4) 選択的神経分化誘導法および神経細胞の活動電位測定：慶応義塾大学医学部生理学教室との共同研究による分化誘導方法を一部改変し、興奮性あるいは抑制性の神経細胞への選択的分化誘導可能なiPS細胞株の樹立を試みた。iPS細胞を次世代微小電極アレイシステム(Maestro; Axion)の48穴プレート内で選択的に神経細胞に分化させ、Maestroを用いて自発的な神経細胞の活動電位を記録した。

## 4. 研究成果

- (1) 「新規DS患者由来iPS細胞の樹立」  
SCN1Aにナンセンス変異を有するDS患者3

名より、新たに疾患特異的 iPS 細胞を樹立した。作出した iPS 細胞はエピソードベクターの残存試験陰性・未分化マーカー発現・正常核型・三胚葉分化能を示した。

(2) 「TALEN 法を用いた人工コントロール iPS 細胞の作出」

TALEN 法を用いて、*SCN1A* 遺伝子のエクソン 26 にナンセンス変異(c.4933C>T, p.R1645\*)を有する DS 患者由来 iPS 細胞(D1 iPSCs)の遺伝子異常の修復を試みた (Fig. 1)。

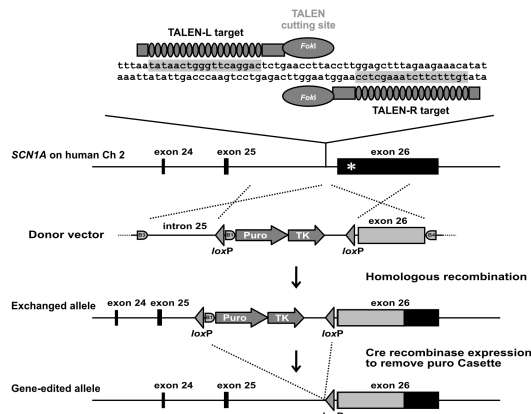


Fig.1. Schematic overview of the genome editing strategy

Puromycin の薬剤選別により、24 個の Puromycin 耐性コロニーを単離した。サンガー法を用いた *SCN1A* 遺伝子における標的領域の配列解析より、1 個の細胞株で目的通りにエクソン 26 にナンセンス変異 (c.4933T) が正常型の塩基 (c.4933C) へ修復されていることを確認した (Fig. 2)。

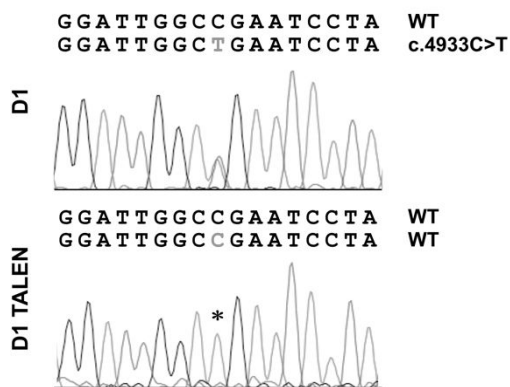
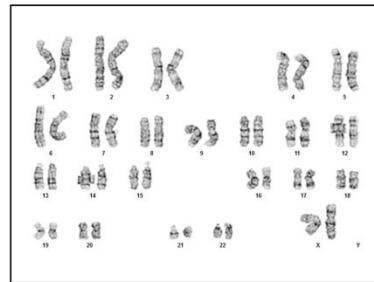


Fig.2. Sequencing chromatograms of the target region.

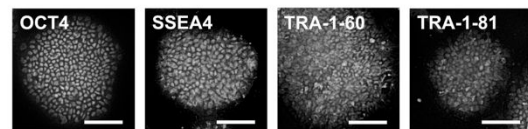
TALEN の off-target 効果により、他の遺伝子に変異が導入されていないことを PROGNOS 及び whole-genome sequencing により確認した。また、この細胞株の核型は正常型 (46, XX) を示した (Fig. 3A)。この iPS 細胞は 4 種類の未分化マーカー遺伝子 (OCT4, SSEA4, TRA-1-60 と TRA-1-81) の発現が見られ、未分化能を有していることを確認した (Fig.

3B)。加えて、iPS 細胞から作成した胚様体由来の細胞において、三胚葉分化マーカー遺伝子 ( $\beta$ -tubulin; 外胚葉, AFP; 内胚葉, SMA; 中胚葉) の発現が見られ、多能性幹細胞であることを確認した (Fig. 3C)。この iPS 細胞を DS iPS 細胞 (D1) のアイソジェニックな人工健全コントロール iPS 細胞 (D1 TALEN iPSCs) とした。

A



B



C

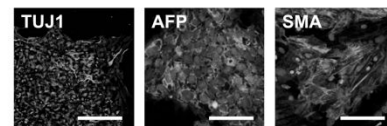


Fig.3. Characterization of D1 TALEN iPSCs.

(3) 「神経分化誘導および機能解析」

正常コントロール iPS 細胞として、健全者由来 201B7 iPSCs とアイソジェニックな人工健全コントロール iPS 細胞である D1 TALEN iPSCs を用いた。DS iPS 細胞として D1 iPSCs を用いた。iPS 細胞をより選択的に分化誘導した神経細胞において、定量的 PCR 法及び免疫組織学的解析により、興奮性および抑制性神経細胞の両方で神経細胞マーカー遺伝子である  $\beta$ -tubulin の良好な発現を確認した。興奮性神経細胞マーカー遺伝子である VGULT2 の発現は、興奮性神経細胞でのみ陽性を示した。一方で、抑制性神経細胞マーカー遺伝子である GAD67 の発現は抑制性神経細胞でのみ陽性を示した。これらの結果より、iPS 細胞より分化した全ての神経細胞が、選択的に興奮性あるいは抑制性神経細胞へ分化誘導されたことが分かり、興奮性あるいは抑制性の神経細胞への選択的分化誘導可能な iPS 細胞株の樹立に成功した。

上記の iPS 細胞群を次世代微小電極アレイシステム (Maestro) の 48 穴プレート内で選択的に神経細胞に分化させ、自発的な活動電位測定を行った。Maestro を用いた神経細胞の機能解析より、興奮性グルタミン酸系ニューロンにおいては、健全コントロールと DS

病態モデル間で自発的なバースト発火中のスパイク数に顕著な違いは認められなかった。今後は、抑制性 GABA 作動性神経細胞については同様の解析を行い、病態の指標となる神経活動の機能差異を探る。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計1件)

Y. Tanaka, T. Sone, N. Higurashi, T. Sakuma, S. Suzuki, M. Ishikawa, T. Yamamoto, J. Mitsui, H. Tsuji, H. Okano and S. Hirose. Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the *SCN1A* gene. *Stem Cell Research*. 査読有, 28 (4), 100-104 (2018).

##### [学会発表](計6件)

Y. Tanaka, T. Sone, N. Higurashi, T. Uchida, M. Ishikawa, H. Okano, S. Hirose. Generation of isogenic iPSC cell line model for Dravet syndrome using TALEN-mediated genome editing of *SCN1A* gene. The 21th Korean Epilepsy Congress (KEC 2016), Seoul, Korea, 2016.6.17.

Y. Tanaka, T. Sone, N. Higurashi, T. Uchida, M. Ishikawa, H. Okano, S. Hirose. Genome editing of *SCN1A* in induced pluripotent stem cells to study the pathomechanisms of Dravet syndrome. The 13<sup>th</sup> Asian and Oceania Congress of Child Neurology (13<sup>th</sup> AOCCN), Taipei, Taiwan, 2015.5.14.

T. Sone, Y. Tanaka, E. Ohta, M. Hosoya, N. Ichianagi, T. Akiyama, N. Higurashi, S. Hirose, H. Okano. TALEN-mediated genome editing of patient-derived iPSCs for disease model studies. Conference on Transposition and Genome Engineering 2015 (TGE2015), Nara, Japan, 2015.11.17.

曾根岳史, 田中泰圭, 太田悦朗, 細谷誠, 馬場庸平, 一柳直希, 日暮憲道, 廣瀬伸一, 岡野栄之, 疾患患者由来 iPSC 細胞を用いた疾患モデル研究のための TALEN によるゲノム編集, 第 14 回日本再生医療学会総会, 横浜, 2015.3.19.

T. Sone, Y. Tanaka, E. Ohta, N. Ichianagi, N. Higurashi, S. Hirose, H. Okano, TALEN-mediated genome editing of patient-derived hiPSCs for

disease model studies, The 18th Takeda Science Foundation Symposium, Osaka, Japan, 2015.1.15.

T. Sone, Y. Tanaka, E. Ohta, N. Ichianagi, N. Higurashi, S. Hirose, H. Okano, TALEN-mediated genome editing of patient-derived hiPSCs for disease model studies, 第 37 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25.

##### [図書](計1件)

田中泰圭, 廣瀬伸一. ドラベ症候群 iPSC 細胞モデルを用いた病態解析. *Research : Central Research Institute NEWS & REPORT*, 21 (2), 11-13 (2016).

##### [産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

##### [その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

田中 泰圭 (TANAKA, Yasuyoshi)  
福岡大学・てんかん分子病態研究所・ポスト・ドクター  
研究者番号: 50714466

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

笹栗 由加里 (SASAGURI, Yukari)